

---

## 研究報文

---

# 小魚の佃煮のビタミン B<sub>12</sub> 供給源としての評価 — 胃内人工消化試験による評価 —

桂 博美

Evaluation of Small Fish “Tsukudani” as a Vitamin B<sub>12</sub> Source

Hiromi Katsura

### Summary

In elderly people, digestive capacity often decreases due to atrophic gastritis or similar. In this situation vitamin B<sub>12</sub> malabsorption occurs. Therefore, it is important to find foods that can be absorbed with vitamin B<sub>12</sub> by elderly people whose digestive capacity has declined. In this study, we analyzed the percentage of free vitamin B<sub>12</sub>/protein bound-vitamin B<sub>12</sub> and the amount of vitamin B<sub>12</sub> in small fish “Tsukudani” that had been boiled for a long time with sugar and soy sauce. As a result of quantification the content of vitamin B<sub>12</sub> contained in five kinds of tsukudani of various small fish there was 9.2 to 28.2  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . When ingesting 10 g of these tsukudani per meal, it was possible to take 0.9 to 2.8  $\mu\text{g}$ . This is equivalent to 40% to 120% of 2.4  $\mu\text{g}$  a day which is the recommended dietary allowance of Dietary Reference Intakes for Japanese. In addition, the following should be noted: Some tsukudani received pressurized heat treatment, some did not. In the tsukudani which received the pressurized heat treatment, the percentage of free-vitamin B<sub>12</sub> content /protein bound-vitamin B<sub>12</sub> content, which is a measure of ease of digestibility, was low and did not increase after the intra-gastric digestion test. Tsukudani in vacuumed packs can be stored for a long time at room temperature, so it is easy for elderly people to use, but on the other hand, when considering the absorption of vitamin B<sub>12</sub>, it is suggested that vacuumed packed tsukudani may be inferior to that which has been boiled without pressure. Therefore, for elderly people whose digestion and absorption ability drops and vitamin B<sub>12</sub> deficiency is a concern, we recommend food that is cooked without pressurization.

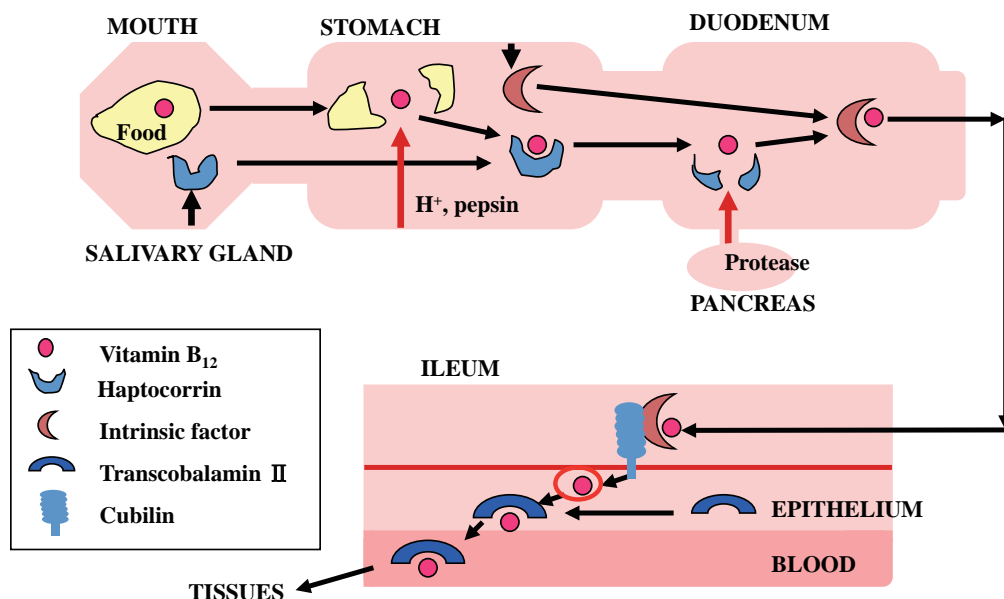
(Received 19 September 2017. Accepted 30 October 2017)

## I. はじめに

ビタミンB<sub>12</sub>は、中心にコバルトを配したコリノイド環を有する分子量の大きなビタミンであり、微生物によって合成される。ビタミンB<sub>12</sub>は、捕食によって動物性食品内に蓄積する、あるいは、ビタミンB<sub>12</sub>産生菌の関与する発酵食品に含まれる。しかし、多量に含まれる食品は限定されている。これら

の動物性食品に含まれるビタミンB<sub>12</sub>のほとんどはタンパク質に結合している。このビタミンの吸収は、胃酸とペプシンによって食品の塊やビタミンB<sub>12</sub>結合タンパク質が分解を受けて胃内で遊離したビタミンB<sub>12</sub>と唾液腺由来のハプトコリンが結合することから始まる<sup>1)</sup>が（図1）、このような複雑な吸収経路を辿るのは、ビタミンB<sub>12</sub>が微量である事に加え、その複雑な構造を判別して吸収しようと試みているためであると考えられている。

萎縮性胃炎など消化吸収能力の衰えた高齢者にお

図1. 食物からのビタミンB<sub>12</sub>の吸収経路

いては、胃内におけるタンパク質の消化能力が低下するため、ビタミンB<sub>12</sub>の吸収率が低下する<sup>2-5)</sup>。これは、タンパク質結合型ビタミンB<sub>12</sub>吸収不全と呼ばれる。このような吸収不全によって、血中ホモシステインの濃度が上昇し、循環器疾患のリスクファクターとなる。ビタミンB<sub>12</sub>欠乏症として知られる巨赤芽球貧血の発症は極めて稀であるが、欠乏症には至る前の、不足の状態（未病の状態）が長期化して引き起こされる高ホモシステイン血漿は高齢者においてしばしば見られ、改善が望まれている。そこで高齢者がビタミンB<sub>12</sub>不足に陥らないために調理・加工形態の異なる食品ごとの情報が必要とされる。

近年、徒歩で買い物に行けた地域の商店が減少し、自動車での購入客を想定した大型スーパーマーケットが増加していることにより、自動車等の移動手段を持たない高齢者が買い物に不自由し、食品を頻繁に購入できないなどの問題が起きている。そのような高齢者にとっては、佃煮などの長期保存食品は買い置きができる面で利用しやすい。我々は、以前、食物学会誌（平成25年）において、長期保存食品を長期保存している際のビタミンB<sub>12</sub>の量的変化や吸収のしやすさへの影響について報告を行った<sup>6)</sup>。その際は、常温保存が可能なロングライフ牛乳とサバの缶詰について評価を行った。今回は、長期保存食品の1つである小魚の佃煮のビタミンB<sub>12</sub>について吸収のされやすさを検討した。

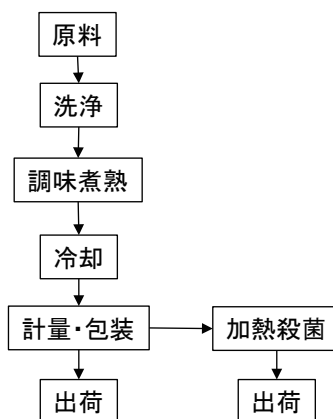


図2. 小魚の佃煮の製造方法

佃煮は、小魚、貝類、エビ類、昆布などの魚介藻類を醤油、砂糖、水飴などの濃厚調味料の中で約30分～40分間煮込んだ製品で（図2）、調味料の種類、配合割合の違いなどによって、佃煮、しぐれ煮、あめ煮、甘露煮などに分類される<sup>7)</sup>。水分活性が低いことから保存性の高い水産加工品として発達してきた。水産物流統計年報（農林水産省[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/suisan\\_ryutu/santi\\_ryutu/index.html](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/suisan_ryutu/santi_ryutu/index.html)）によれば、水産物佃煮類の年間生産量は約40%を占める昆布を除くと、近年では生産量が最も高かった1990年代初めの約8万トンから2015年には約4万トンにまで半減してい

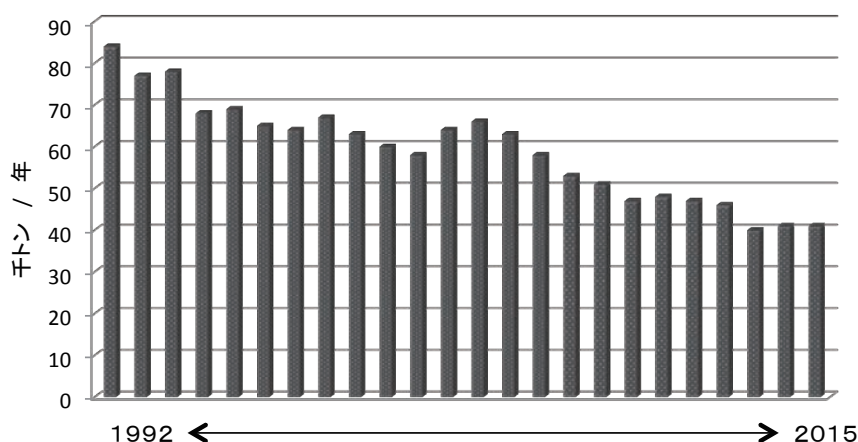


図3. 1992年～2015年の水産物の佃煮類（昆布除く）の生産量  
（農林水産省ホームページ，水産物流統計年報の公表データより作図）

る（図3）。また、佃煮は、小魚、貝類、エビ類を内臓を含め丸ごと食す形態の加工食品であり、江戸時代においては良質なタンパク質やミネラル（特にカルシウム）が慢性的に不足していた農村部における栄養面での役割が大きかったと考えられている<sup>7)</sup>。さらに、動物食品の特に内臓に多く含まれるビタミンB<sub>12</sub>についても農村部などにおける補給効果が高かったと推測される。そこで、その保存性や食品の特徴から高齢者にとって小魚の佃煮がビタミンB<sub>12</sub>供給源として期待できるのではないかと考えた。日本食品標準成分表2015によれば、例えば「いかなご」の場合に含まれるビタミンB<sub>12</sub>は、生で11.0 μg/100g、煮干しで46 μg/100g、つくだ煮で7.8 μg/100g、あめ煮で7.2 μg/100gであるとされている。煮干しは生のいかなごをゆでこぼしてから乾燥させるため、ゆでこぼしを行わないつくだ煮やあめ煮の方がビタミンB<sub>12</sub>の残存量が高いと考えられる。また、市販されている佃煮には、煮熟後に真空パックされ常温保存を目的に加圧加熱を受けた商品と、煮熟された後すぐにパック詰めされた要冷蔵の商品がある。よって、これらの加工工程の違いがビタミンB<sub>12</sub>の吸収にどのような影響を与えるのか検討する必要がある。ビタミンB<sub>12</sub>はその特異な吸収経路から、胃内において塩酸とペプシンでタンパク質が消化されて、ビタミンB<sub>12</sub>が遊離し、唾液腺由来のハプトコリンと結合するための準備がなされることが吸収の第一段階として重要である。このため、胃内の状況を再現するために胃内人工消化試験を行い、胃内における総ビタミンB<sub>12</sub>量に占める遊離型ビタミンB<sub>12</sub>

割合を決定することで、吸収のしやすさとして評価できる。そこで、本研究では、佃煮に含まれるビタミンB<sub>12</sub>の吸収のされやすさに与える加工方法の影響を明らかにするために、これらの食品の胃内人工消化試験後の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合を測定し検討した。

## Ⅱ. 方法

### 1. 材料・試薬

佃煮は京都市内で市販されている、淡水産（びわ湖産）のこあゆ、石もろこ、ごり、海産のいかなご、いわしを購入し試料とした。また、胃内人工消化試験には、購入した試料（5種）のうちのこあゆといかなごを用いた。さらにこあゆについては、加圧加熱処理のない要冷蔵の商品（以下、釜炊き）と常温保存を目的に加圧加熱処理された真空パックの商品（以下、真空パック）の二種を用いた。また、いかなごは釜炊きを用いた。

標品ビタミンB<sub>12</sub>はシグマ社（アメリカ合衆国）より、ペプシン（1：10000）はナカライテスク株式会社（京都）より、ビタミンB<sub>12</sub>定量用基礎培地は、日水製薬株式会社（東京）より、ATCC7830株は、American Type Culture Collection（アメリカ合衆国）より購入した。その他一般的な試薬はナカライテスク株式会社（東京）のものを用いた。また、試料の粉碎にはBLAS-101（日本精機株式会社）を使用し、ゲル濾過用のカラムはAmersham Biosciences社のPD-10 Columnを、プロテインアッセイCBB溶液（5倍濃縮）および牛血清アルブミンはナカライ

テスク株式会社より購入して用いた。その他一般的な機器を使用した。

## 2. ビタミン B<sub>12</sub> 定量方法

佃煮 20g に重量比 1 : 1 で蒸留水を加え、ブレンダーで均一化した。これに蒸留水 40ml と 0.02% KCN 含む 0.25mol/l 酢酸緩衝液 (pH4.9) 30ml を加えて混和し、沸騰水浴中で 1 時間シアノ化熱水抽出を行った。なお、抽出も含め、以後の作業は全て遮光して行った。抽出後は、常温まで冷却し、重ねたガーゼでこして遠心分離 (3,000rpm, 5 分) を行って上清を得て小分けして冷凍保存し、定量の際に随時解凍し、定量用試料とした。

ビタミン B<sub>12</sub> の定量は、ビタミン B<sub>12</sub> 要求菌である *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 の増殖活性を利用した微生物学的定量法を用いて行った。なお、本法は日本標準食品成分表の定量において採用されている方法であり、これに準じてビタミン B<sub>12</sub> 定量用培地に前培養した前述の菌を接種して 18 時間培養した後、菌の増殖活性 (770nm, 濁度 ; 100 - % T) を測定した。

## 3. 胃内人工消化試験および遊離型ビタミン B<sub>12</sub> 割合の決定方法

佃煮の胃内人工消化試験は次の通り行った。胃内人工消化試験は、アンソン法をもとに一部改変し、佃煮 1g を褐色試験管に取り、0.01% ペプシン溶液 2ml および 0.06mol/l-HCL 溶液 29ml を加え、恒温槽で 30 分間消化した。1mol/l-NaHCO<sub>3</sub> 溶液 5ml を加えて反応を停止し、水中で 5 分間冷却した後、遠心分離 (3,100rpm, 15 分間) してその上清を胃内人工消化後試料とした。人工消化試験前後の煮汁試料および固体試料のそれぞれ 0.5ml にグリセリン 0.15ml を加えて混和し、PD-10 を用いてゲル濾過し、ろ液を 0.5ml ずつ回収し 24 本に分画した。24 本の各画分についてビタミン B<sub>12</sub> を前述の方法に準じてシアノ化して定量し、さらに CBB 溶液を用いた色素結合法によりタンパク質を定量した。高分子であるタンパク質結合型ビタミン B<sub>12</sub> はフラクション 7 前後に溶出し、遊離型ビタミン B<sub>12</sub> はフラクション 11 前後に溶出したことを予め確認していたことから、先の定量結果から得られた溶出パターンとピークの位置より、タンパク質結合型ビタミン B<sub>12</sub> 割合および遊離型ビタミン B<sub>12</sub> 割合を決定した。

## 4. 統計

各試料における胃内人工消化試験前後の遊離型ビタミン B<sub>12</sub> の割合の変化を統計学的に検討するため、t 検定 (エクセル統計) を行い危険率 5% を有意差ありとした。

## Ⅲ. 結果および考察

### 1. 市販されている種々の佃煮に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量

市販されている佃煮を購入し、これらに含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量の変化を検討した。その結果を表 1 に示した。100g あたりのビタミン含有量は、こあゆが最も高く、28.2 μg であり、肝臓などの最もビタミン B<sub>12</sub> を多く含む食品に匹敵する量が含まれていることが分かった。こあゆと同じびわ湖産である石もろこごりは、それぞれ、9.2 μg/100g と 10.3 μg/100g であり、他の多くの食品に比べれば高いビタミン B<sub>12</sub> を含んでいたが、こあゆの約 1/3 に留まった。また、海産のいかなごいわしのビタミン B<sub>12</sub> 含有量は、それぞれ 18.1 μg/100g、15.0 μg/100g であり、比較的多量のビタミン B<sub>12</sub> が含まれていた。佃煮の常食量を約 10g と考えると、こあゆで 2.8 μg、石もろこで 0.9 μg、ごりで 1.0 μg、いかなごで 1.8 μg、いわしで 1.5 μg であり、ビタミン B<sub>12</sub> の 1 日の摂取目安である推奨量 (2.4 μg) の約 40% ~ 120% 含まれていることが分かった。また、一度の食事において胃内に分泌される内因子 (IF) の分泌量に相当するビタミン B<sub>12</sub> 量が 2.0 μg であることから、佃煮に含まれている全てのビタミン B<sub>12</sub> を一度の食事で摂取した際には、70% ~ 90% の吸収が期待できる。また、データは示していないが、1 年間冷凍庫内で保存したこあゆの佃煮に関してはビタミン B<sub>12</sub> が全く減少しておらず、大変保存性が高いことも確認された。食品としての消費期限は守る必要があるが、消費期限内であれば佃煮中のビタミン B<sub>12</sub> はほとんど減少しないことが明らかになった。

表 1. 小魚の佃煮に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 量

産地等	魚 種	ビタミン B <sub>12</sub> (μg/100g)
淡水産 (琵琶湖)	こあゆ	28.2 ± 0.8
	石もろこ	9.2 ± 1.2
	ごり	10.3 ± 1.5
海 産	いかなご	18.1 ± 3.4
	いわし	15.0 ± 2.6

値は、平均 ± 標準偏差で示した (n=3~6)。

## 2. こあゆおよびいかなごの佃煮の胃内人工消化試験後の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合

次に、3種の佃煮〔こあゆ（釜炊き）、こあゆ（真空パック）、いかなご（釜炊き）〕についてそれぞれ、胃内人工消化試験前および胃内人工消化試験後の試料を用意してゲル濾過分画を行った。その結果を表2に示した。胃内人工消化試験前の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合は、釜炊きのこあゆで73%、真空パックのこあゆで61%、いかなごの釜炊きで90%であった。また、胃内人工消化試験後には、釜炊きのこあゆで90%に有意に増加したが、真空パックのこあゆでは62%で消化前と変化しなかった。また、いかなごについては、消化前にすでに90%と高い遊離型割合を示したため、消化試験は行わなかった。これら3種の佃煮を比較すると、釜炊きのこあゆといかなごの比較では、いかなごの方が消化前の状態で遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が高く、タンパク質消化能力が低下した高齢者に適した食品と評価することができた。また、こあゆについて加工方法の違いによって比較すると、加圧加熱処理を伴う真空パックの方は、消化前の状態でも釜炊きより遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合が低かったが、消化試験後もその割合が増加しなかった。よって、真空パックされたこあゆでは、ビタミンB<sub>12</sub>結合タンパク質が分解されにくくなっている可能性が考えられた。

表2. 小魚の佃煮に含まれる遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合の胃内人工消化試験前後の変化

食品名	加工法	遊離型ビタミンB <sub>12</sub> 割合 (%)	
		消化試験前	消化試験後
こあゆ	釜炊き	73 ± 9 <sup>a</sup>	90 ± 4 <sup>b</sup>
	真空パック*	61 ± 2 <sup>c</sup>	62 ± 6 <sup>c</sup>
いかなご	釜炊き	90 ± 10	—

値は、平均±標準偏差で示した（n=3）。

\*：真空パックされた後、常温での長期保存を可能にするために加圧加熱された商品

ab：こあゆ（釜炊き）は消化試験前後で有意に遊離型VB<sub>12</sub>割合が上昇した。

C：こあゆ（真空パック）は消化試験前後で遊離型VB<sub>12</sub>割合が変化しなかった。

## 3. 他の魚介類やその加工品との比較

これまでに我々は、種々の魚介類を含む食品について、胃内人工消化試験を行い、タンパク質結合型ビタミンB<sub>12</sub>を含めた総ビタミンB<sub>12</sub>に占める遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合を示してきた。今回、報告した小魚の加工品である佃煮をこれまで発表したサバと牛乳（加圧加熱を伴う殺菌を行った食品）との比較を試みた。平成26年にビタミン誌<sup>8)</sup>にて発表した

サバの水煮における消化試験後の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が84%でありサバの缶詰の同割合が30%であり、遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合が大きく減少していた。さらに、牛乳においても無殺菌牛乳およびLTLT殺菌乳（低温長時間殺菌）では、消化試験後の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合がそれぞれ66%と63%であるのに対し、高温短時間殺菌であるUHT殺菌乳では、遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が31%と大きく減少した。加圧加熱処理の有無が関与していることを推察した。これらの減少は、加熱にさらに圧力が加わりタンパク質周囲の水が排除され体積が減少し、また、疎水的な会合などが起こるため結合タンパク質からビタミンB<sub>12</sub>が遊離されにくくなった可能性がある可能性が考えられた。今回の佃煮においても加圧加熱のされていない釜炊きのこあゆでは消化試験後の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が90%であったのに対し、常温保存を目的とした真空パックのこあゆでは、消化試験後の遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が62%に減少していた。これらの食品における遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合の減少が同様のメカニズムであるとする、食品の加圧加熱処理がビタミンB<sub>12</sub>の吸収に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。保存を目的とした殺菌方法の開発は近年の進歩が目覚ましい。しかしながら、佃煮は本来、醤油や砂糖によって水分活性を低下させて保存性を高めている食品である。よって、真空パックにして加圧加熱殺菌を行わなくても、冷蔵庫で数日間は安全に食することができる。以上の事より、消化機能が低下した高齢者がより多くのビタミンB<sub>12</sub>を吸収するためには、真空パックで加圧加熱処理されたものより、釜炊き後にパック詰めされて市販されている佃煮を摂取した方が望ましいことが示唆された。

## IV. 要約

高齢期には、しばしば萎縮性胃炎などにより消化能力が低下する。このような状況ではビタミンB<sub>12</sub>吸収不全が起こる。よって、消化能力が低下した高齢者でも吸収できる食品を見つけることが重要である。種々の小魚の佃煮5種類に含まれるビタミンB<sub>12</sub>含有量を定量した結果、9.2～28.2 μg/100gであった。一度の食事で10g摂取すると0.9～2.8 μg摂取でき、これは日本人の食事摂取基準の推奨量である2.4 μg/日の40%～120%に相当していた。また、こあゆの佃煮において、加圧加熱処理のない釜炊きと加圧加熱処理を伴う真空パックにおいて消化試験前の吸収しやすさの目安である遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割



合を比較すると、釜炊きの方が高く、消化試験後も遊離型ビタミンB<sub>12</sub>割合が有意に上昇した。一方の真空パックの方が遊離型ビタミンB<sub>12</sub>の割合が低く、胃内人工消化試験後も増加しないことが明らかにされた。真空パックの佃煮は、常温で長期間保存できることから高齢者が利用しやすいものであるが、一方でビタミンB<sub>12</sub>の吸収を考える上では、釜炊きに劣る可能性が示唆された。よって消化吸収力が低下しビタミンB<sub>12</sub>不足が危惧される高齢者には、真空パックされていない釜炊きの佃煮を推奨する。

## V. 謝辞

本研究は、平成25年度および平成26年度の京都女子大学の個人研究費を使用して行いました。本研究に協力して下さった桂研究室の岡本結衣さんと執行風子さんに感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) Castle WB and Hale TH, 'The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health'(4<sup>th</sup> ed) ed by Gerald F. Combs, Jr., pp 377-394 (2012) Elsevier Academic Press, Burlington, MA (USA)
- 2) Baik HW and Russell RM, "Vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the elderly" *Annu Rev Nutr*, **19** 357-377 (1999)
- 3) Carmel R. "Malabsorption of food cobalamin" *Baillieres Clin. Haematol*, **8**(3), 639-655 (1995)
- 4) Alison K. Campbell, Joshua W. Miller, Ralph Green, Mary N. Haan and Lindsay H. Allen, "Plasma Vitamin B<sub>12</sub> Concentrations in an Elderly Latino Population are Predicted by Serum Gastrin Concentrations and Crystalline." *J. Nutr.* **133**(9), 2770-2776 (2003)
- 5) 渡辺文雄, "ビタミンB<sub>12</sub>と高齢者" *ビタミン* **83**, 369-373 (2009)
- 6) 桂博美, 中上奈緒 "長期保存食品中ビタミンB<sub>12</sub>の保存による変化", *京都女子大学食物学会誌*, **68**, 5-10 (2013)
- 7) 福田裕・山澤正勝・岡崎恵美子監修, 全国水産加工品総覧, 光琳出版, pp 139-180 (2005)
- 8) 桂博美, 乾博, 土居幸雄 "調理・加工食品中ビタミンB<sub>12</sub>の吸収効率—高齢者に適した食品の検討—" *ビタミン*, **88**(5・6), 267-274 (2014)